

F₂

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) Veröffentlichungsnummer: **0 298 210 B1**

(12)

EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT

(45) Veröffentlichungstag der Patentschrift: **08.12.93**

(51) Int. Cl.⁵: **G01N 33/531, C07K 7/08**

(21) Anmeldenummer: **88106747.4**

(22) Anmeldetag: **27.04.88**

(54) **Verfahren zur selektiven immunologischen Bestimmung von intaktem Prokollagen Peptid (Typ III) und Prokollagen (Typ III) in Körperflüssigkeiten und Mittel zu dessen Durchführung.**

(30) Priorität: **02.05.87 DE 3714634**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
11.01.89 Patentblatt 89/02

(45) Bekanntmachung des Hinweises auf die
Patenterteilung:
08.12.93 Patentblatt 93/49

(64) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(56) Entgegenhaltungen:
EP-A- 0 004 940
EP-A- 0 089 008

CLINICAL CHEMISTRY, Band 31, Nr. 8, 1985;
O. NIEMELÄ, Seiten 1301-1304&NUM;

CHEMICAL ABSTRACTS, Band 97, Nr. 1, 5.
Juli 1982, Columbus, OH (US); **N. SUNDAR-
RAJ et al.**, Seite 444, Nr. 4431s&NUM;

BIOLOGICAL ABSTRACTS, Band 83, Nr. 6,
1987, Philadelphia, PA (US); **H. KONDO**, Seite
AB-267, Nr. 52561&NUM;

(73) Patentinhaber: **HOECHST AKTIENGESELL-
SCHAFT**

D-65926 Frankfurt(DE)

Patentinhaber: **Max-Planck-Gesellschaft zur
Förderung der Wissenschaften e.V.**
Bunsenstrasse 10
D-37073 Göttingen(DE)

(72) Erfinder: **Brocks, Dietrich, Dr.**
Goethering 9
D-6200 Wiesbaden(DE)
Erfinder: **Timpl, Rupert, Dr.**
Julius Haerlinstrasse 3
D-8035 Gauting(DE)

EP 0 298 210 B1

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99(1) Europäisches Patentübereinkommen).

Beschreibung

Prokollagen Peptid (Typ III) ist das aminotermi-
nale Propeptid des Kollagen (Typ III), das nach
Sezernierung des Prokollagen (Typ III)-Moleküls
extrazellulär abgespalten wird. Mit einer radioim-
munologischen Bestimmungsmethode, wie sie in
der Europäischen Patentschrift Nr. 4940 beschrie-
ben ist, kann die Konzentration dieses Prokollagen
Peptids in Körperflüssigkeiten bestimmt werden.
Die Kenntnis der Serumkonzentration des Peptids
erlaubt Aussagen über die Aktivität fibrotischer Er-
krankungen, wie z.B. der Leber [Rohde, H. et al.
Eur. J. Clin. Invest 9, 451 - 459 (1979)].

Die exakte, selektive Bestimmung von Prokolla-
gen Peptid (Typ III) in Serum und anderen Körper-
flüssigkeiten ist mit den bisher beschriebenen Me-
thoden aber nicht möglich, da die polyklonalen
Antikörper, die in diesen Methoden eingesetzt wer-
den, mit verschiedenen, im Serum vorkommenden
Antigenen, die zum Teil Abbauprodukte des Prokol-
lagen Peptids (Typ III) darstellen, mit unterschiedli-
cher, niedrigerer Affinität reagieren [Niemelä, O. et
al. Clin. Chim. Acta 124, 39 - 44 (1982)]. Dies führt
dazu, daß die Serumverdünnungskurven und die
Verdünnungskurven anderer Körperflüssigkeiten
zur Eichkurve, die mit reinem Prokollagen Peptid
(Typ III) erstellt wird, nicht parallel sind und daher
von jeder unbekannten Probe der Antigengehalt in
mehreren Verdünnungen bestimmt werden muß, um
die Antigenkonzentration über den 50 % Interzept
der Verdünnungskurve zu ermitteln.

Ein weiterer Nachteil dieser Verfahren ist, daß
aufgrund einer zu geringen Kreuzreaktivität der An-
tikörper mit Ratten- bzw. Mäuseantigen eine Be-
stimmung der Antigenkonzentration in Körperflüs-
sigkeiten dieser Spezies nicht möglich war.

Mit Hilfe des Verfahrens, das von Schuppan et
al. [J. Hepatol. 3,27-37 (1986)] beschrieben wurde,
kann die Konzentration der Antigene im Rattense-
rum bestimmt werden. Allerdings hat dieses Ver-
fahren den gleichen auch bei der Methode für
Humanseren beschriebenen Nachteil [Niemelä et
al. Clin. Chim. Acta 124, 39 - 44 (1982)] der nicht
parallelen Inhibitionskurven bei verschiedenen Kör-
perflüssigkeiten.

Mit Hilfe des Verfahrens der Europäischen Pa-
tentanmeldung 0089008 ist es möglich, dieses
technische Problem zu lösen, indem Antikörper
eingesetzt werden, die für intaktes Prokollagen
Peptid (Typ III) und sein Abbauprodukt Col 1 ver-
gleichbare Affinität haben. Mit diesem Verfahren
werden intaktes und degradiertes Prokollagen Pep-
tid (Typ III) gemeinsam bestimmt, was jedoch zur
Ungenauigkeit in der diagnostischen Aussage führt,
da Normalkollektiv und Patientenkollektiv stark
überlappen können.

Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß
bei Verwendung eines Peptids mit einer bestimm-
ten Aminosäuresequenz für die Immunisierung An-
tikörper erhalten werden können, mit Hilfe derer
eine spezifische Bestimmung des intakten Prokol-
lagen Peptids (Typ III) möglich ist. Mit diesen Anti-
körpern kann überraschenderweise auch der Pro-
kollagen Peptid (Typ III)-Gehalt in Körperflüssigkei-
ten von Ratte oder Maus bestimmt werden, was für
die tierexperimentelle Erprobung fibrosuppressiver
Substanzen von Nutzen ist.

Die Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur
immunologischen Bestimmung von aminoterminal-
em Prokollagen Peptid (Typ III) mit Antikörpern,
das dadurch gekennzeichnet ist, daß

a) Tiere mit einem Peptid der Sequenz

I-C-E-S-C-P-T-G-G-Q-N-Y-S-P,

gebunden an ein immunogenes Protein immuni-
siert werden,

b) aus dem Serum die Antikörper gewonnen
werden, die mit intaktem aminoterminalen Pro-
kollagen Peptid (Typ III) reagieren und

c) die Menge des aminoterminalen Prokollagen
Peptids (Typ III) und des Prokollagens (Typ III)
über den gebildeten Antigen-Antikörper-Kom-
plex bestimmt wird.

Ferner betrifft die Erfindung Antikörper, die
durch Immunisierung von Tieren mit obengenannt-
em Peptid entstehen, das an ein immunogenes
Protein gebunden ist.

Im folgenden wird die Erfindung detailliert be-
schrieben, insbesondere in ihren bevorzugten Aus-
führungsformen. Ferner wird die Erfindung in den
Ansprüchen definiert.

Zur Herstellung der Antikörper werden Tiere,
bevorzugt Nagetiere, wie z.B. Kaninchen, Meer-
schweinchen, oder Ziege und Schaf mit dem Pep-
tid der Sequenz

I-C-E-S-C-P-T-G-G-Q-N-Y-S-P

gekoppelt an ein geeignetes immunogenes Protein
in Gegenwart von komplettem Adjuvans immuni-
siert. Besonders bevorzugt werden Kaninchen ein-
gesetzt. Mit wiederholten Sekundäinjektionen, bei-
spielsweise im Abstand von 4 bis 8 Wochen, wird
die Immunantwort verstärkt. Der Erfolg der Immuni-
sierung wird durch Bestimmung der Konzentration
von Antikörpern im radioimmunologischen Bin-
dungstest kontrolliert [R. Timpl und L. Risteli, Im-
munochemistry of the extracellular matrix, H. Furth-
mayr Ed., Vol. 1, 199 (1982)].

Geeignete Proteine, an die das genannte Pep-
tid gebunden sein kann sind alle immunogenen
Proteine. Bevorzugt werden Hämocyanin, Albumin
oder Polylysin verwendet. Das Peptid kann nach
dem Fachmann bekannten Methoden hergestellt
werden, wie z.B. von G. Barany und A. B. Merrifield
in The Peptides Vol. 2, pp 3-254 (1980), Academic
Press oder E. Brown, R. C. Sheppard und B. J.

Williams, J. Chem. Soc. Perkin Transact. 1, 1161 (1983) beschrieben.

Die erfindungsgemäßen Antikörper können als Serum oder gereinigt in verschiedenen immunologischen Verfahren, einschließlich allen Formen des Radioimmunassays, z.B. sequentielle Sättigungsanalyse oder Gleichgewichtsanalyse, gegebenenfalls nach Markierung mit Chloramin T oder Bolton-Hunter-Reagenz [Felber, Meth. Biochem. Anal. 22, 1 (1974); Shelley et All, Clin. Chem. 19, 146 (1975)] sowie in anderen kompetitiven Bindungsassays, wie Fluoreszenz-, Enzymimmunoassay, Chemilumineszenz oder anderen Immunoassays verwendet werden. Die Antikörper können daher in immunologischen Verfahren zur Isolierung und Charakterisierung sowie zur quantitativen Bestimmung von Prokollagen Peptid (Typ III) in Geweben und Körperflüssigkeiten eingesetzt werden. Zur quantitativen Bestimmung verfährt man nach den dem Fachmann an sich bekannten Methoden, indem eine flüssige Probe, die Prokollagen Peptid (Typ III) enthält, mit den erfindungsgemäßen Antikörpern zur Reaktion gebracht wird und die Menge des Prokollagen Peptids (Typ III) über den gebildeten Antigen-Antikörper-Komplex bestimmt wird. Dabei spielt es keine Rolle, ob das Prokollagen Peptid (Typ III) noch mit dem Aminoterminus des Prokollagen (Typ III) verknüpft ist oder nicht. Die bislang bei der immunologischen Bestimmung störenden Degradationsprodukte des Prokollagen Peptids (Typ III), insbesondere das Col 1, werden von den erfindungsgemäßen Antikörpern nicht miterfaßt.

In den folgenden Beispielen wird die Erfindung weitergehend erläutert. Prozentangaben beziehen sich auf das Gewicht, wenn nicht anders angegeben.

Beispiel 1

Herstellung der Peptid-Hämocyanin Konjugat-Verbindung

100 mg Hämocyanin (dialysiert gegen 5 x 3 l Wasser und dann lyophilisiert) löst man in 3 ml Wasser und gibt 24 mg des Peptids I-C-E-S-C-P-T-G-G-Q-N-Y-S-P zu. Unter Rühren bei Raumtemperatur setzt man im Verlauf von 2 Stunden in Portionen insgesamt 1 g N-Cyclohexyl-N'-[2-(4-morpholinyl)-ethyl]carbodiimid-methyl-p-toluolsulfonat zu. Nach Rühren über Nacht dialysiert man das Reaktionsgemisch 24 Stunden gegen insgesamt 5 x 10 l Wasser, und isoliert das Produkt anschließend durch Gefriertrocknung. Man erhält 137 mg der Konjugatverbindung.

Beispiel 2

Radioimmunbindungstest

5 300 µl Antiserum vom Kaninchen, immunisiert mit dem gemäß Beispiel 1 hergestellten Konjugat, in geeigneter Verdünnung werden mit 100 µl einer Prokollagen Peptid Typ III Lösung (1 ng Protein/100 µl, hergestellt wie in EP 4940, Beispiel 1, beschrieben), welches mit ¹²⁵J radioaktiv markiert ist, über Nacht inkubiert. Die gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe werden durch Zugabe eines gegen Immunglobulin G der zur Immunisierung verwendeten Spezies gerichteten Antiserums einer anderen Spezies ausgefällt. Nach Zentrifugation und Dekantieren des Überstandes wird die Menge der präzipitierten Radioaktivität im γ-Szintillationsspektrometer bestimmt.

Beispiel 3

Radioimmun-Test

25 0,2 ml der zu analysierenden Probe oder des Prokollagen Peptid (Typ III)-Standards werden mit einer in Bezug auf die Menge des markierten Antigens limitierenden Menge von Antiserum (in 0,1 ml Puffer) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach Zugabe von 0,1 ml ¹²⁵J markiertem Prokollagen Peptid (Typ III) (enthält 1 ng Protein) wird 6 - 8 Stunden bei 4 °C inkubiert. Die gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe werden mittels eines gegen IgG der zur Immunisierung verwendeten Spezies gerichteten Antiserums präzipitiert. Nach Abzentrifugation und Dekantierung des Überstandes wird die gefällte Radioaktivität im γ-Szintillationsspektrometer bestimmt.

Durch Vergleich mit einer Eichkurve, zu deren Erstellung Standards mit unterschiedlichen Konzentrationen von Prokollagen Peptid (Typ III) eingesetzt werden, kann dann die Konzentration von Prokollagen Peptid (Typ III) in der unbekannten Lösung bestimmt werden.

Beispiel 4

Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung der mit dem erfindungsgemäßen Antikörpern reagierenden Antigene im Serum von z.B. Rind und vom Schwein

55 1 ml Serum werden per Gelfiltrationschromatographie über eine Sephacryl S 300® Säule (1,6 x 130 cm), äquilibriert in "phosphate buffered saline" PBS mit 0,04 % Tween® 20, aufgetrennt. Je 0,2 ml der Fraktionen (jede 2,8 ml) werden in den Radioimmun-Test nach Beispiel 3 eingesetzt.

Abb 1a zeigt das Elutionsprofil des Antigens aus Schweineserum, Abb. 1b das des Antigens aus Rinderserum im Vergleich zum Profil des nach EP 4940 bestimmten Antigens. Die Peaks 1/1a entsprechen intaktem Prokollagen Typ III bzw. pN-Kollagen Typ III (Prokollagen, dem das C-terminale Ende fehlt); Peaks 2/2a entsprechen intaktem aminoterminalen Prokollagen Peptid Typ III; Peaks 3/3a entsprechen Col 1 sowie Abbauprodukten des aminoterminalen Prokollagen Peptids Typ III mit gleichem Molekulargewicht wie Col 1.

Patentansprüche

Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten : AT, BE, CH, DE, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE

1. Verfahren zur immunologischen Bestimmung von aminoterminalen Prokollagen Peptid (Typ III) mit Antikörpern, dadurch gekennzeichnet, daß
 - a) Tiere mit einem Peptid der Sequenz
I-C-E-S-C-P-T-G-G-Q-N-Y-S-P
gebunden an ein immunogenes Protein immunisiert werden,
 - b) aus dem Serum die Antikörper gewonnen werden, die mit intaktem aminoterminalen Prokollagen Peptid (Typ III) reagieren und
 - c) die Menge des aminoterminalen Prokollagen Peptids (Typ III) und/oder des Prokollagen Typ III über den gebildeten Antigen-Antikörper-Komplex bestimmt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid an Hämocyanin, Albumin oder Polylysin gebunden ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß Nagetiere oder Ziege oder Schaf immunisiert werden.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß Kaninchen immunisiert werden.
5. Antikörper erhältlich durch Immunisierung von Tieren mit dem Peptid der Sequenz
I-C-E-S-C-P-T-G-G-Q-N-Y-S-P
gebunden an ein immunogenes Protein.
6. Antikörper nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid an Hämocyanin, Albumin oder Polylysin gebunden ist.
7. Antikörper nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß Nagetiere oder Ziege oder Schaf immunisiert werden.
8. Antikörper nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß Kaninchen immunisiert werden.

9. Verbindung bestehend aus dem Peptid der Sequenz
I-C-E-S-C-P-T-G-G-Q-N-Y-S-P
gebunden an ein immunogenes Protein.

10. Verwendung der Verbindung nach Anspruch 9 als Antigen.

Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten : ES, GR

1. Verfahren zur immunologischen Bestimmung von aminoterminalen Prokollagen Peptid (Typ III) mit Antikörpern, dadurch gekennzeichnet, daß
 - a) Tiere mit einem Peptid der Sequenz
I-C-E-S-C-P-T-G-G-Q-N-Y-S-P
gebunden an ein immunogenes Protein immunisiert werden.
 - b) aus dem Serum die Antikörper gewonnen werden, die mit intaktem aminoterminalen Prokollagen Peptid (Typ III) reagieren und
 - c) die Menge des aminoterminalen Prokollagen Peptids (Typ III und/oder des Prokollagen Type III über den gebildeten Antigen-Antikörper-Komplex bestimmt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid an Hämocyanin, Albumin oder Polylysin gebunden ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß Nagetiere oder Ziege oder Schaf immunisiert werden.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß Kaninchen immunisiert werden.

Claims

Claims for the following Contracting States : AT, BE, CH, DE FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE

1. A method for the immunological determination of amino-terminal procollagen peptide (type III) using antibodies, which comprises
 - a) immunization of animals with a peptide of the sequence
I-C-E-S-C-P-T-G-G-Q-N-Y-S-P
bound to an immunogenic protein,
 - b) obtaining from the serum the antibodies which react with intact amino-terminal procollagen peptide (type III) and
 - c) determination of the amount of amino-terminal procollagen peptide (type III) and/or of procollagen type III via the antigen-antibody complex which is formed.

2. The method as claimed in claim 1, wherein the peptide is bound to hemocyanin, albumin or polylysine.
3. The method as claimed in claim 1 or 2, wherein rodents or goats or sheep are immunized.
4. The method as claimed in claim 3, wherein rabbits are immunized.
5. Antibodies obtainable by immunization of animals with the peptide of the sequence
I-C-E-S-C-P-T-G-G-Q-N-Y-S-P
bound to an immunogenic protein.
6. Antibodies as claimed in claim 5, wherein the peptide is bound to hemocyanin, albumin or polylysine.
7. Antibodies as claimed in claim 5 or 6, wherein rodents or goats or sheep are immunized.
8. Antibodies as claimed in claim 7, wherein rabbits are immunized.
9. A compound composed of the peptide of the sequence
I-C-E-S-C-P-T-G-G-Q-N-Y-S-P
bound to an immunogenic protein.
10. The use of the compound as claimed in claim 9 as an antigen.

Claims for the following Contracting States : ES, GR

1. A method for the immunological determination of amino-terminal procollagen peptide (type III) using antibodies, which comprises
 - a) immunization of animals with a peptide of the sequence
I-C-E-S-C-P-T-G-G-Q-N-Y-S-P
bound to an immunogenic protein,
 - b) obtaining from the serum the antibodies which react with intact amino-terminal procollagen peptide (type III) and
 - c) determination of the amount of amino-terminal procollagen peptide (type III) and/or of procollagen type III via the antigen-antibody complex which is formed.
2. The method as claimed in claim 1, wherein the peptide is bound to hemocyanin, albumin or polylysine.
3. The method as claimed in claim 1 or 2, wherein rodents or goats or sheep are im-

munized.

4. The method as claimed in claim 3, wherein rabbits are immunized.

Revendications

Revendications pour les Etats contractants suivants : AT, BE, CH, DE, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE

1. Procédé pour la détermination immunologique de peptide aminoterminal du procollagène (type III) à l'aide d'anticorps, caractérisé en ce que :
 - a) on immunise des animaux avec un peptide de séquence
I-C-E-S-C-P-T-G-G-Q-N-Y-S-P
lié à une protéine immunogène,
 - b) à partir du sérum, on récupère les anticorps qui réagissent avec le peptide aminoterminal intact du procollagène (type III), et
 - c) on détermine la quantité du peptide aminoterminal du procollagène (type III) et/ou la quantité de procollagène de type III d'après le complexe antigène-anticorps formé.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le peptide est lié à l'hémocyanine, à l'albumine ou à la polylysine.
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'on immunise des rongeurs ou des chèvres ou des moutons.
4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'on immunise des lapins.
5. Anticorps qu'on peut obtenir par immunisation d'animaux avec le peptide de séquence
I-C-E-S-C-P-T-G-G-Q-N-Y-S-P
lié à une protéine immunogène.
6. Anticorps selon la revendication 5, caractérisé en ce que le peptide est lié à l'hémocyanine, à l'albumine ou à la polylysine.
7. Anticorps selon la revendication 5 ou 6, caractérisé en ce qu'on immunise des rongeurs ou des chèvres ou des moutons.
8. Anticorps selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'on immunise des lapins.
9. Composé constitué du peptide de séquence
I-C-E-S-C-P-T-G-G-Q-N-Y-S-P
lié à une protéine immunogène.

10. Utilisation du composé selon la revendication 9 comme antigène.

Revendications pour les Etats contractants suivants : ES, GR

5

1. Procédé pour la détermination immunologique de peptide aminoterminal du procollagène (type III) à l'aide d'anticorps, caractérisé en ce que : 10
- a) on immunise des animaux avec un peptide de séquence
I-C-E-S-C-P-T-G-G-Q-N-Y-S-P
lié à une protéine immunogène,
- b) à partir du sérum, on récupère les anticorps qui réagissent avec le peptide aminoterminal intact du procollagène (type III), et 15
- c) on détermine la quantité du peptide aminoterminal du procollagène (type III) et/ou la quantité de procollagène de type III, d'après le complexe antigène-anticorps formé. 20
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le peptide est lié à l'hémocyanine, à l'albumine ou à la polylysine. 25
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'on immunise des rongeurs ou des chèvres ou des moutons. 30
4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'on immunise des lapins.

35

40

45

50

55



